

令和元年6月17日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01359

研究課題名(和文)チタン多孔体とチタンゲル化処理による血管内皮誘導を促進する血管用デバイス

研究課題名(英文)Development of blood cannula based on porous Titanium structure and titanium-gel modification for promoting in vivo neointimal growth

研究代表者

関根 一光 (SEKINE, Kazumitsu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・講師

研究者番号：50447182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：人工心臓適用時に用いられるチタン製血管カニューレとして、周囲の生体血管内皮組織が早期に創生進展する構造体を目標に、チタン材バルク体表面へ多孔体を焼成・焼結することでその多孔体構造内への組織誘導性を、またチタン材表面を細胞賦活化表面足場材とした化学的修飾による、構造学的・生化学的作用によるハイブリッドチタン製足場評価検討をおこなった。そのような試料について、化学的修飾体の定量、早期での細胞接着性による細胞賦活効果の確認、さらに生体内軟組織への埋入後の引き抜き試験により、生体組織への「組織癒合性」を評価した。多孔質構造と化学的修飾によるチタン製足場材として、有利性のある足場材となり得る結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題は生体親和性材料であるチタンを基材として、“多孔質性材料の表面積の拡張”と“孔質への組織侵入性”という構造学的アプローチ、また“細胞接着性の向上”と“組織創生への高い足場効果”という生化学的アプローチを複合的に作用させることでの早期癒合性の細胞・組織足場効果をコンセプトとしている。現時点では、最終的なデバイスデザインには至っていないが、本課題の“自由度”として、患者様や術式に応じた孔質や形状で作成できる、いわばカスタムメイド医療としての側面も持ち合わせており、この“自由度”を軟組織以外を対象としたインプラント材料の開発としても検討したい。

研究成果の概要(英文)：We have developed the titanium(Ti) blood cannula to promote neo-intimal growth of surrounding tissues, especially of vascular endothelium for applying the patients of ventricular assist devices. Our device has two characters, the first is the micro-porous structure based on the custom-made sintering of micro Ti powders. And the second point is the chemical modification for promoting the earlier cell adhesion and the cell culture to configure the extracellular matrix in an early stage of post-operative-day. Our motivation is to evaluate the composite scaffold with a hybridized smart structure. To evaluate them, we have studied “the quantification of chemical modification level of Ti surface”, “the cell adhesions tests”, and “the pull-out study after the implantation on connective tissues”. Those results indicated that our Ti hybrid scaffold has the potentials with the advantages of structural and biochemical characters to promote neo-intimal growth of implanted surround tissues.

研究分野：人工臓器学

キーワード：生体材料 人工臓器 生体適合性 足場材料

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医療と技術の進歩により、近年の心疾患患者様に対する補助人工心臓(VAD)の適用については、心臓移植までのつなぎとする“bridge-use”だけでなく、VADを終身使用する“destination-therapy”とすることが可能になり、今後もこのような適用例が増えると想定される。VADの施術において左室補助を例とすると、心尖部から脱血してVADで血流を発生し、大動脈へと送血するバイパス方式が用いられる。そのため、この脱血および送血するためのカニューレ(血液挿管)によって「生体心-VAD-生体大動脈」とつなぐ。そのつなぎ目において生体組織と人工材料の結合部位が出来るため、管としての弾性の異なる人工物の表面に触れることで血液の滞留が起こり易く、また人工物表面への血液接触により微小血栓の形成や付着が容易に起こる。この微小血栓形成により肥大化した血栓はカニューレ近傍での塞栓を引き起こし、また血中への飛散は全身での心源性血栓塞栓症の引き金となる。以上のような理由から、人工物となるカニューレ表面には、例えばヘパリンなどの化学的な抗血栓性表面処理がおこなわれる。しかし、化学的抗血栓性処理法は比較的短期でしか効果が無く、長期間の埋込においては万全とは言えない。よって、術後早期に人工物表面に自己の血管内膜と同等な組織が新生・創生することが、最良の血液接触表面であると思われる。

2. 研究の目的

本課題では、人工物表層に対する近接の組織、特に本課題における使用条件においては生体心や大血管の内皮などの自己内膜組織を形成する前駆細胞の誘導と、それらの術後早期での組織化による内膜組織の創生形成を目的として、形状のアレンジメントが可能な手法でチタン(Ti)微粒粉の焼結によるTi多孔体の血液接触表面を作製し、またそのチタン材表層を化学的処理により組織誘導形成を促進する、という2つの要素技術を組み合わせたハイブリッド血液接触表面をVADのカニューレとして応用すべく、開発研究を進める。このハイブリッド血液接触表面を、VAD用Ti製血管カニューレの先端周囲や血管との接合部位、または血液の溜まりが想定される部位などへの、適切な微細Ti多孔体表面として作製する。多孔体は近傍血管もしくは近傍心室の内皮細胞や血中の血管内皮前駆細胞などの細胞足場として機能することを目的とし、それに加えて水酸化処理による親水性表面化、さらには意図した組織の誘導因子の有効な固定をおこなうことで、「自由形状での構造学的+生化学的な細胞足場 生理学的に馴染みの良い、早期自己内膜化」を実現する相互的なTi製足場効果の特徴として、開発研究をおこなっている。本課題では、上述の多孔体表面による構造学的手法について、全貫通型構造、片面が閉塞された半貫通型構造による孔質、孔体積と表面積の違いと、その表面に対する化学的足場材改質効果によって受ける影響について、両手法を相互的に検討する事を目的とした。

3. 研究の方法

本課題で使用するTi多孔体構造の作成手法は以下の通りである。超音波振るいにより平均粒径150 μ mに調整したアトマイズ法球形Tiマイクロ粒子を、歯科用インレーワックス樹脂と適切な混合比で加熱混和する。冷却後の成形体を得た後に、ワックス焼却炉において380 $^{\circ}$ C、3時間の条件でワックス成分を焼却し、グリーン体を作成した。これを1,100 $^{\circ}$ C、Ar置換下の条件で2時間焼結処理することで、Ti粒子による多孔体を得る。ここで、本課題における実験では、将来的なカニューレへの応用を踏まえて、チタン試料の厚みを2mmとしている。そこで、各実験に応じた任意形状での成形について、チタン多孔体のみで厚み2mmに作成した試料をopened試料、厚み1mmのチタンバルク材上に厚み1mmで同じく任意形状にチタン多孔体を成形・焼結したものをsemi-opened試料、また比較対照として同形状で厚み2mmのチタンバルク材を40番研磨紙で研磨し、蒸留水中で超音波洗浄し、風乾させたものをclosed試料とした。実際に作成した各試料について、円盤状試料の模式図を図1に、実際に作成した試料例を図2に示す。試料の半分は過酸化水素水による水酸化Ti処理の後、コラーゲン溶液を塗布した後、風乾処理し、その後にウレタン様処理をおこなった。

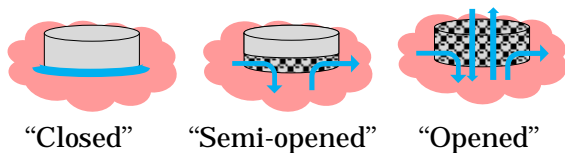


図1 Ti試料模式図

軟組織(ピンク床部)に対するガス・体液代謝自由度(青)の模式図



図2 実際に作成したTi試料

また、チタン材表層を足場材とする化学的な修飾方法については以下の通りである。 任意

形状のチタン材試料を 15 mL/片の過酸化水素水に浸漬し、60 恒温環境で 48 時間保持した。超純水での超音波洗浄後に風乾した後、0.5 mg/L に調整した酸性 Type-I コラーゲン溶液 (KOKEN) を過酸化水素水処理群および未処理群の各試料に 200 μ L/mm² 量を滴下し、風乾させた。その後、3 mL/片のイソシアネート-ベンゼン溶液に浸漬し、60 恒温環境で 3 時間保持することで、チタン表面にウレタン様構造表面を作成した。冷却後にはベンゼン溶液、続いて超純水で各 3 回洗浄し、風乾させた。これを OH-Col 群とした。なお、本法によるウレタン様表面作成の実証は、「科学研究費・若手研究 (B) 25750162」において光学分析および分光定量法により報告済である。

これら手法により作成した試料について、以下に実験方法を示す。

(1) コラーゲン固定量同定評価

方法 における opened および closed 試料について、方法 1 の化学的修飾の有無による、試料体積当たりでの固定量同定をおこなった。定量は固定成分を塩酸水溶液で脱離遊離した溶液中のタンパク質を定量することで、固定された Type-I コラーゲン量を推察した。

各試料について、リン酸緩衝液で 3 回浸漬洗浄の後、ガラス製遠沈管内の塩酸水溶液中に浸漬し、12 時間振とう機で攪拌し、試料に固定されたタンパク質の遊離脱離溶液を得た。これをタンパク質定量アッセイ (PierceTM Modified Lowry Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) により定量した。対称タンパク製剤として、アルブミン (Sigma) および方法 1 で用いた酸性 Type-I コラーゲン溶液を用いた。

(2) 細胞接着性評価

方法 2 により直径 4 mm、厚み 2 mm で成形した Open, Semi-closed, Closed の各試料を作成し、各試料の半数を方法 1 の化学的手法により、細胞賦活効果処理を施した。各試料は EOG 滅菌処理した。第一の評価として、方法 1 の化学的修飾の有無しでの比較として、closed 試料上にマウス繊維芽細胞様細胞 NIH3T3 を 5×10^4 個/試料となるようにウェルプレート中で試料表面に播種し、5%CO₂ 条件のインキュベータ内で 24 および 48 時間培養した。培養終了後に緩衝液で洗浄し、Phalloidin による F-actin の蛍光染色および DAPI による核の蛍光染色をおこなった。蛍光顕微鏡 (TE2000U, Nikon) による生細胞数確認と F-actin 伸展性の確認と評価をおこなった。Open, Semi-closed, Closed の各試料も上記と同条件で細胞の播種、および培養をおこない、比色定量法 (WST-8, Dojindo) により生細胞数増殖能を吸光度より定性的に評価した。

(3) 組織癒合性評価

動物実験については、徳島大学動物実験委員会の審査と許可の元でおこなった。方法 2 により直径 4 mm、厚み 2 mm で成形した Open, Semi-closed, Closed の各試料を作成し、各試料の半数を方法 1 の化学的修飾により、細胞賦活効果処理を施した。各試料は EOG 滅菌処理した。伏臥位の固定状態で麻酔下とした 6 週齢雄性ラットの背部を切開し、筋層上層に切開を入れ、筋層を背部に平行に剥離することで筋層ポケットを作成した。これを右背部、左背部に対称に作成し、右背部に方法 1 を取らない (= 以後、“未処理群”) 試料を、左背部に方法 1 を施した試料を、それぞれ opened, semi-opened, closed を無作為に筋層ポケット底部に静置した。semi-opened は多孔体面を底部側に静置した。各試料はいずれも筋層へは固定せず、そのまま筋層ポケット上部の切開部、および皮膚を吻合した。埋入後、1 週、2 週および 4 週の通常の給餌給水期間での生育の後、麻酔下において筋層ポケット部を切開し、ポケット内の試料上部を露出した状態で、伏臥位での背部に対し垂直方向への引き抜き強度試験をおこなった。引張試験様式としたデジタルフォースゲージ (ZTS-200N, イマダ) の治具に、円盤試験片の掴み部加工を施した鉗子を固定し、試験片の垂直方向への引張強度を測定した。すべての試料群について、試験片底部の直径を 4 mm として引き抜き強さを癒合強度とした。また、一部の試験片は組織切片作成用として、引き抜き試験をおこなわずに、試料と底部の組織ごと一塊として摘出した。摘出した試料は生理食塩水とリン酸緩衝液で洗浄後、10%ホルマリン液中で 24 時間固定した。固定完了後にリン酸緩衝液で洗浄後、レジン系包埋剤 (テクノビット 7200VLC, Kulzer) で包埋した。

4. 研究成果

研究方法 (1) ~ (3) に従って述べる。

(1) 図 3 に試料体積 (Opened については、孔質を考慮しないみかけの試料体積) 当たりでの Type-I コラーゲン同定定量を示す。(+)については方法 1 での化学的修飾有りを示している。化学的手法無しについて比べると、多孔質体で構成される Opened は、体表面積のみの Closed と比較して 10 倍以上のコラーゲン修飾がおこなえていることがわかる。多孔質構造は不規則であるため、その表面積の測定が困難であるが、40%程度の孔率でも優位に表面積の拡張がおこなえていることがわかった。ただし、孔内には不特定かつ無数のラビリンス構造であるため、試験前の浸漬による洗浄でもそのラビリンス構造内に滞留したコラーゲンが漏出しにくい可能性もあるため、表面における厚みは不均一であるがために、試験では多くの遊離脱離量となった感は否めない。また、化学的修飾をおこなうことで、バルク体の Closed 試料でも未修飾群と比較して 5 倍以上のコラーゲンチャージが確認できた。この結果は、本課題の化学的修飾は血液

や体液などの還流下においても、ウレタン様構造を維持し、細胞賦活効果の持続的効果の可能性を示す結果でもあった。なお、多孔質である Opened 試料では Closed の 5 倍程度のコラーゲンチャージ量であることが確認できたため、多孔質構造が拡張されることにより細胞賦活効果を有益にすることを示す結果でもある。Opened 試料間での化学的修飾の有無についても、修飾処理ことにより 2 倍程度に増加することがわかった。

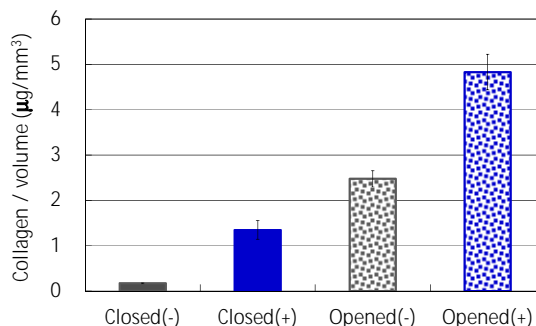


図3 化学的修飾効果のタンパク質定量による確認

(2) 図4に24時間および48時間培養後の DAPI 蛍光像を、また図5に各試料8例、計40撮像の DAPI 蛍光像から計数した生細胞核数の定量を示す。併せて化学的修飾の中途過程である未処理でコラーゲン塗布試料、および水酸化処理試料を“Col”、“TiOH”として呈示する。24時間像では、各試料間において生細胞数に変化が無いように見えるが、48時間像では TiOH および Closed(+)において顕著に増加している様子が確認出来、像からの計数によっても Closed(-) と比してそれぞれ2倍、2.5倍程度の増加が確認出来た。仮説として、コラーゲン塗布によるウレタン様構造により、接着性細胞の伸展に影響を与えることで細胞外マトリクスが早期に構成され、細胞増殖への寄与、そしてその後の組織化に繋がると考えていたため、ファロイジン染色像から F-actin の伸展性の違いを、蛍光像の pixel 数で定量化することを試みた。結果を図6に示す。試料中心部の蛍光像から各試料100個超の pixel 数計数による画像解析をおこなったが、各試料間で有意差は表れなかった。24時間での細胞数に変化が無く、48時間で劇的に変化が見られることから、試料表面における初期時間での細胞の接着性や伸展性には違いが表れると考えられるため、今後 Vinculin による接着斑解析などで確認したい。また比色呈色法による評価についても、蛍光像観察と同様に24時間では化学的修飾の有無による差が現れず、48時間では優位な差が表れた。Opened および Semi-opened 試料においても同様であったが、今回の多孔体試料群の培養環境では孔からの細胞漏出が起きているのか、表面積比に相対する Closed 試料との差とはならなかったことから、培養条件の検討が必要であると考え、本報告においての結果の呈示を控えたい。

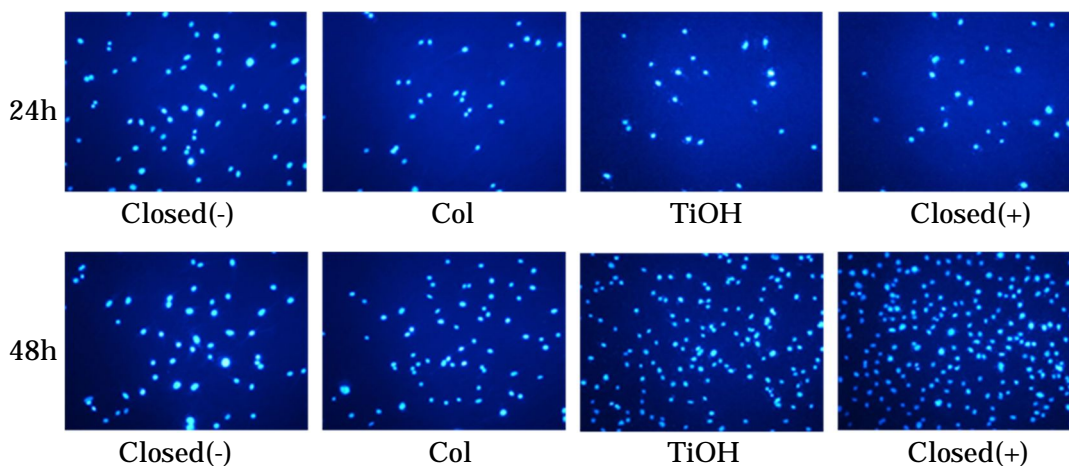


図4 24時間および48時間培養後の DAPI 蛍光像

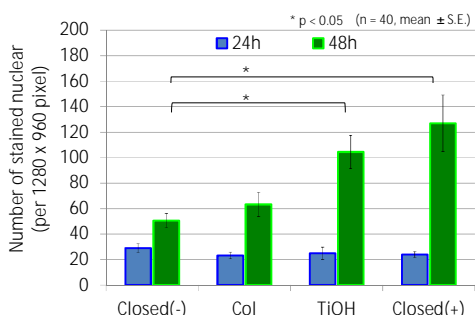


図5 24時間および48時間培養後の DAPI 像からの生細胞数計数

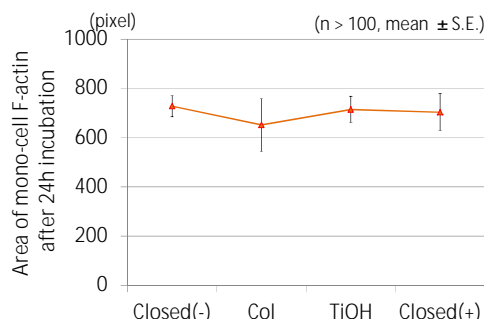


図6 Phalloidin 蛍光染色像による F-actin 伸展の pixel 数計測

(3)癒合性を確認するための生体内留置試料による引き抜き強度試験の結果を図7に示す。化学的に未修飾な群については、Closedではいずれの生育期間後の結果においてもほぼ癒合が見られず、組織展開時の体動等で試料の動きが表れるほどに癒合が起きていなかった。一方、Semi-openedとOpenedの多孔体群では1週目の段階で明らかな癒合が起きており、OpenedはSemi-openedと比して高い癒合強度を示した。また、化学的修飾を施した試料については、その癒合強度がさらに向上しており、多孔体群それぞれの試料について1週と2週では2倍程度、4週で1.3倍程度の癒合強度を示した。癒合の進行は生育期間が進むにつれて頭打ちとなるはずであり、1週および2週で2倍程度の癒合強度を示したことは、化学的修飾による早期癒合効果であると言え、本課題で提唱する多孔質による構造かつ化学的修飾によるハイブリッドな足場効果の向上を示す結果であったと言える。

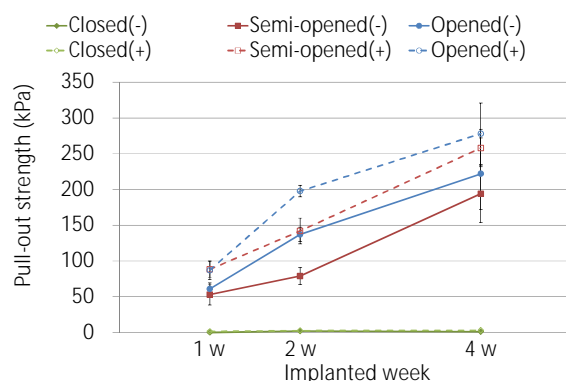


図7 ラット背部筋層への埋入による癒合強度評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Yoko Henmi, Yoshihito Naito, Ryo Jimbo, Yohei Jinno, Kazumitsu Sekine and Kenichi Hamada : Bone Ingrowth to Ti Fibre Knit Block with High Deformability, Journal of Oral & Maxillofacial Research, Vol.7, No.4, p.e2, 2016 (DOI: 10.5037/jomr.2016.7402)(査読有り)

〔学会発表〕(計 15 件)

(1) 関根 一光, 馬場 麻人, 浜田 賢一 : 細胞賦活性を施した多孔質チタン足場材に関する生体内癒合性評価, 第56回日本人工臓器学会大会, 2018年11月(東京都・港区)

(2) Kazumitsu Sekine, Yoshihito Naito, Tetsuo Ichikawa, Otto Baba, Kenichi Hamada : Development of structural and chemical enforcement of neointimal growth as the blood contacting surface for the vascular prosthesis, 45th European Society for Artificial Organs(XLV ESAO Congress), 2018年9月(Spain・Madrid)

(3) 関根 一光, 馬場 麻人, 浜田 賢一 : 硬組織代替材料への応用を目的としたチタン表面への細胞賦活効果の検討, 第57回日本生体医工学会大会, 2018年6月(北海道・札幌市)

(4) 関根 一光, 山下 菊治, 浜田 賢一 : 血管内皮新生を目的としたチタン粒子焼結による多孔性チタン表面の軟組織癒合性評価, 第39回日本バイオマテリアル学会大会, 2017年11月(東京都・江戸川区)

(5) 関根 一光, 山下 菊治, 浜田 賢一 : 血管内皮新生の促進効果を狙った多孔性チタン材への表面加工の検討, 第55回日本人工臓器学会大会, 2017年9月(東京都・千代田区)

(6) 関根 一光, 裊 志英, 浜田 賢一 : 多孔質化と表面処理による複合的なチタン製血液接触表面材料としての試み, 第56回日本生体医工学会大会, 2017年5月(宮城県・仙台市)

(7) 関根 一光, 山下 菊治, 浜田 賢一 : 細胞接着性の向上を狙ったチタン材への水酸化処理法の癒合性足場材料としての検討, 第54回日本人工臓器学会大会, 2016年11月(鳥取県・米子市)

(8) 邊見 蓉子, 内藤 禎人, 神保 良, 神野 洋平, 関根 一光, 浜田 賢一 : 3次元多孔性チタン織物の変形能と in vivo における骨伝導能, 日本バイオマテリアルシンポジウム 2016, 2016年11月(福岡県・福岡市)

(9) Prananingrum Widyasri, Yoshihito Naito, Kazumitsu Sekine, Kenichi Hamada and Tetsuo Ichikawa : Application of porous titanium in tailored post-core systems using a moldless process: evaluation of the physical and mechanical properties with different particle sizes, International Dental Materials Congress 2016, 2016年11月(Indonesia・Bali)

(10) 邊見 蓉子, 関根 一光, 神野 洋平, 神保 良, 内藤 禎人, 友竹 偉則, 浜田 賢一 : 高い変形能を示す多孔性チタン織物の骨伝導能, 日本金属学会 2016 年秋季大会, 2016 年 9 月(大阪府・豊中市)

(11) Prananingrum Widyasri, Yoritoki Tomotake, Yoshihito Naito, Kazumitsu Sekine, Kenichi Hamada and Tetsuo Ichikawa : Sintering Time and Its Influence on Moldless-Processed Porous Titanium's Properties, 94th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 2016 年 6 月 (Korea・Seoul)

(12) Henmi Yoko, Yoshihito Naito, Jinbo Ryo, Jinno Yohei, Kazumitsu Sekine and Kenichi Hamada : Development of three-dimensional porous titanium web for bone defect filling, Thermec' 2016, 2016 年 6 月 (Austria・Graz)

(13) 関根 一光, 内藤 禎人, 市川 哲雄, 山下 菊治, 浜田 賢一 : Surface modification of titanium scaffold for applying cell growth promotion, 第 55 回日本生体医工学会大会, 2016 年 4 月 (富山県・富山市)

(14) 邊見 蓉子, 内藤 禎人, 関根 一光, 浜田 賢一 : 骨欠損部に充填する三次元多孔性チタン織物の開発, 第 67 回日本歯科理工学会学術講演会, 2016 年 4 月 (福岡県・福岡市)

(15) 関根 一光, 内藤 禎人, 浜田 賢一 : 細胞賦活効果向上を目的としたチタン材表面処理法, 第 67 回日本歯科理工学会学術講演会, 2016 年 4 月 (福岡県・福岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

Web ホームページ

<https://www.tokushima-u.ac.jp/dent/research/oralscience/basic.html#rikou>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 浜田 賢一

ローマ字氏名: (HAMADA, Kenichi)

所属研究機関名: 徳島大学

部局名: 大学院医歯薬学研究部 (歯学域)

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 00301317

研究分担者氏名: 内藤 禎人

ローマ字氏名: (NAITO, Yoshihito)

所属研究機関名: 徳島大学

部局名: 大学院医歯薬学研究部 (歯学域)

職名: 徳島大学専門研究員

研究者番号 (8 桁): 20509773

(2) 研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。